

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：32617

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461807

研究課題名(和文) ハイブリットMRI造影剤創製と動物実験による他の造影剤との性能の基礎的比較検討

研究課題名(英文) Hybrid MRI contrast agent and basic comparison of performance with other contrast agents using animal experiment

研究代表者

嶋田 守男 (Shimada, Morio)

駒澤大学・医療健康科学部・教授

研究者番号：20196489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：間質におけるリンパ流の評価は鉄剤にて可能であったが、粒子径や希釈濃度の選択によっては造影されない場合もあり、適切な選択の必要性がある。また我々は、肝機能を評価する材料として、NASHモデルのマウスを作成し正常マウスとの比較を行った。我々は、両マウス群に、ICGを投与した。我々はその後5分毎にIVISにて撮影し解析を行った。検討の結果ICGによる蛍光からNASHの進行を検出することができた。新規結合体であるPHG10色素は、細胞毒性を目標にしてコラーゲンペプチドと近赤外線反応色素を用いて合成された。生体高分子PPGを出発物質とし、多段階の合成過程を経てGd-PPGを得た。

研究成果の概要(英文)：Evaluation of lymph flow in interstitium was possible with iron preparation. Depending on the selection of the particle diameter and dilution concentration, there are cases in which contrast imaging is not available, and appropriate selection is necessary. We prepared a mouse of NASH model as a material to evaluate liver function and compared it with normal mouse. We administered ICG to both groups of mice. We imaged by IVIS every 5 minutes, And analyzed these images. As a result of examination, the progression of NASH could be detected from the fluorescence by ICG. A novel conjugate, PHG10 dye, was synthesized using a collagen peptide and a near-infrared (NIR)-responsive dye to achieve targeted cytotoxicity. Using biopolymer PPG as a starting material, Gd-PPG was obtained through multi-step synthesis process.

研究分野：MRI 造影剤 動物実験

キーワード：MRI 造影剤 蛍光イメージング コラーゲンペプチド Gd マウス

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、コラーゲンペプチドの温度応答性を利用して、分子の集積をスイッチし、生体分子間の親和性を制御するシステムを確立している（研究分担者 Okada et al. Bicojugate Chem. 2013）。

本研究では、コラーゲンペプチドという短くかつ定まった構造を持たせた全く新しい温度応答性 MRI 造影剤の創製を狙う。

また、それと並行して、動物実験によるその他の造影剤の特性性能を比較検討する基礎検討も行う。

2. 研究の目的 1) MR Lymphography ではガドリニウム製剤の陽性造影剤の他に陰性造影剤の鉄剤による報告が散見される。鉄剤は静注により全身のリンパ節を同時に評価可能であるが、その一方でセンチネルリンパ節評価のようにリンパ流の評価はこれまで行われていない。目的は鉄剤を間質に投与し、リンパ流の評価が行えるかを検討することにある。MR 画像において鉄剤の濃度による信号変化についてファントムを用いて評価した。引き続き、マウス後脚間質に粒子径、濃度の異なる鉄剤を投与して、リンパ節の描出について評価した。

### 2) 背景および目的

今日、臨床における ICG の蛍光マーカーとしての用途は表在性血管の観察といった定性的なものである。しかし、ICG の肝臓に取り込まれる性質を利用し、その蛍光を捕らえることで、肝機能評価への応用が可能ではないかと考えた。また、蛍光イメージングによる肝機能評価は、採血検査では不可能である機能低下部位の特定が期待できる。

本実験の目的は、ICG の蛍光から肝機能进行评估できるか検討することにある。肝機能进行评估する対象として、NASH モデルのマウスを作成し、正常マウスとの比較を行った。

3) 本研究では、コラーゲンペプチドという短くかつ定まった構造を持たせた全く新しい温度応答性 MRI 造影剤の創製を狙う。

## 3. 研究の方法

### 1) a 撮像法

データ収集は 1.0T MRI 装置 (ICON, Bruker BioSpin 社製) を用いた。鉄剤は SPIO (粒子径 50nm, 100nm) と USPIO (粒子径 20nm) を使用した (以下それぞれ 100nm, 50nm, 20nm)。撮像シーケンスは T1 強調 3D-FLASH を用いた。

### b ファントムによる至適濃度の検討

20 から 100 倍まで希釈濃度を変えた 3 種類の粒子径の鉄剤を造影剤注入用エクステンションチューブ内にいれてファントムを作成し、CuSO<sub>4</sub> フ

アントムとともに撮像した。得られたデータから ImageJ (NIH, Bethesda, MD, Ver. 1.49h) を用いて SNR を算出し、至適濃度を決定した。

### c 生体内での造影効果の比較

マウス (日本クレア) を用い、イソフルランにて麻酔を行い、投与する鉄剤の希釈濃度は各粒子径に対しそれぞれ 10 倍希釈, 20 倍希釈, 60 倍希釈とした。投与する造影剤量は 20  $\mu$  とし、インスリン投与用の 30G シリンジを用いて後脚の第 1 指と第 2 指の間隙皮下に間質投与した。撮像のタイミングは投与前, 5 分後, 15 分後, 30 分後, 1 時間後, 3 時間後とした。得られた画像から膝窩リンパ節と仙骨リンパ節における造影効果を経時的に視覚評価した。撮像は各粒子径と希釈濃度の組み合わせ 9 種類に対しそれぞれ 3 回ずつ行った。

### 2) a 使用機器

- IVIS 0Series XENOGEN 社製
- Living Image Software Version 2.50

### b NASH モデルマウスの作成<sup>1)</sup>

生後 2 日目の雄マウスに対し、10g/L 濃度の STZ (ストレプトゾトシン) を 20  $\mu$ L 皮下投与した。4 週齢からは高脂肪の試料を与えた。STZ は膵臓の細胞を破壊し、糖尿病モデルを作成するとき用いられる試薬である。NASH モデルマウスの作成方法はいくつかあるが、先行研究により、この作成方法によるマウスは人間と同じ進行で脂肪肝を発症させるとの報告がされたため、こちらの方法をとった。この方法では 6 週齢で脂肪肝を発症し、8 週齢で肝細胞の風船様腫大や炎症が発生する。

### c IVIS 撮影方法



Fig. 1 IVIS 撮影体位

蛍光イメージングの撮影は IVIS を用いた。IVIS のカメラは撮影台の上側にある。肝臓からの蛍光を捕らえるため、撮影は仰向けで行った (Fig.

1) 腹部の体毛は蛍光を吸収するため、撮影前にシェービングクリームを用いて除毛を行った。また、腹部の消化管からの自家蛍光の影響を防ぐため、黒いビニールテープを貼った。

ICG は 1.0g / L 濃度に溶解し、マウスの体重 1 kg あたり ICG 5mg となる量 (体重 20g のマウスでは、ICG 溶液 100  $\mu$ L) を、高眼窩静脈叢から投与した。両群のマウス共に、ICG 投与前を pre として撮影した後、ICG 投与後 5 分から 60 分まで 5 分毎に撮影した。正常マウスは 6 匹用意し、9 週齢および 13 週齢にて撮影を行った。NASH マウスは 9 匹用意し、8 週齢、10 週齢、12 週齢にて撮像を行った。

#### d データ解析

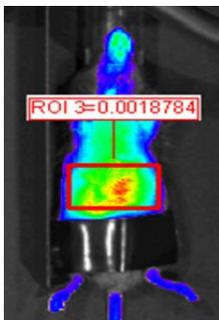


Fig. 2 ROI の位置

Living Image Software (Version 2.50)を用いて、蛍光イメージング上の腹部 (肝臓領域) に四角い ROI を置き、蛍光量 (efficiency) を測定した (Fig.2)。efficiency は、各 pixel の入射光子に対する蛍光光子の相対値を算出し、ROI 内における平均値を示す。したがって単位は無く、ICG 投与後でも  $10^{-4\sim6}$  程度の小さい値である。これを(1)式に示すように ICG 投与前に対する相対値として正規化し、取り込み率として評価した。また同様に、(2)式に示すように、投与後 5 分に対する相対値として正規化し、洗い出し率として評価した。

$$\text{取り込み率} = \frac{\text{各時間の蛍光量}}{\text{ICG 投与前の蛍光量}} \quad (1)$$

$$\text{洗い出し率} = \frac{\text{各時間の蛍光量}}{\text{ICG 投与後 5min の蛍光量}} \quad (2)$$

#### 3) 薬剤分子のデザインと合成

温度や分子の集合状態に応答する新しい MR 造影剤を創製することを目的とし、 $Gd^{3+}$  と生体高分子を融合させた分子 (Gd-PPG, Gd-POG) をデザイ

ンした (Fig. 3)。生体高分子には、分子の集積特性が環境 (温度・pH) によって応答するペプチド (PPG、および、POG) を利用した。また、 $Gd^{3+}$  近傍の基本骨格は Gd-DOTA (MAGNESCOPE) に類似のものを組み込み、リンカーでこれら二つのパーツを結合させた。リンカーを利用することで、立体障害によって生体高分子の機能が制御されることを抑止した。このデザインをもとに化学合成した Gd-PPG および Gd-POG は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC, SHIMADZU) で精製し、質量分析装置 (MS (ESI-TOF), Bruker) で同定した。

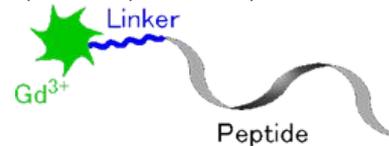


Fig. 3 Structure of Gd-PPG and Gd-POG.

#### T1 と r1 の導出法

IR 法 (inversion recovery method) にもとづき、MR (0.5 T, TOSHIBA) の信号強度から導出した。まず、TE (2000 ms) を固定して  $T_I$  (200 - 800 ms) と変化させた条件で、各サンプルに対する ROI の信号強度  $S(T_I)$  を計測した。続いて、得られた  $S(T_I)$  を用いて Eq. 1 に対して最小二乗法でフィッティングし (Bidhult *et al.* *BMC Medical Imaging*, 2016)、緩和時間  $T_1$  (ms) を求めた。また、サンプルの濃度から、緩和度  $r_1$  ( $L \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) を算出した。

$$S(T_I) = A \times (1 - 2 \times e^{-T_I/T_1}) \quad (\text{Eq. 1})$$

#### 4. 研究成果

##### 1) a ファントムによる至適濃度の算出

SNR より、いずれの粒子径でも 60 倍希釈鉄剤の信号強度が高い傾向にあり、至適濃度であると考えられた。

##### b 生体内での造影効果の比較

鉄剤投与側のすべての膝窩リンパ節および一部の仙骨リンパ節に陰性の造影効果が観察され、対側のリンパ節にはみられず、リンパ流の評価を鉄剤にて行えた。膝窩リンパ節の造影前と造影後の画像を Fig4,5 に示す。

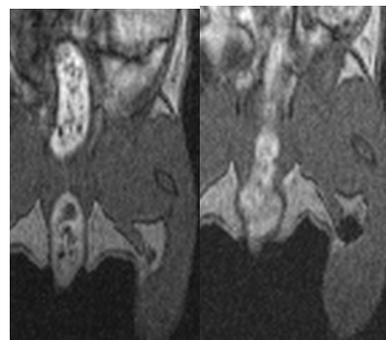


Fig.4

Fig.5

いずれの粒子径・希釈濃度でも投与して5分後からリング状の陰性の造影効果がみられた。粒子径の違いによる造影効果の明らかな違いはみられなかったが、高い濃度において3時間後に均一に造影される傾向があった。

## 2)a 蛍光イメージングからの視覚情報

静注されたICGは、投与後全身へまわり、速やかに肝臓へ取り込まれ、その後徐々に洗い出されていく様子が確認できた。60分後には、ICGが胆汁と共に排出されたことにより、消化管から蛍光が見られた。

### b 取り込み率評価

取り込み率を縦軸、ICG投与後の時間を横軸に作成したグラフをFig. 6, 7として示す。

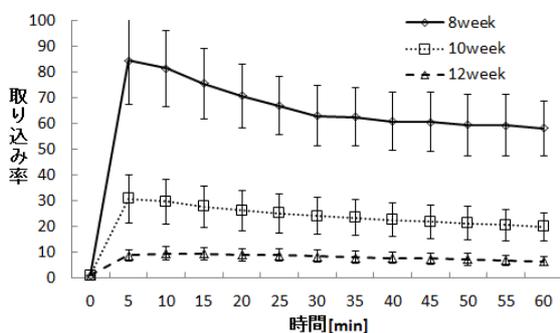


Fig. 6 NASH マウス 取り込み評価

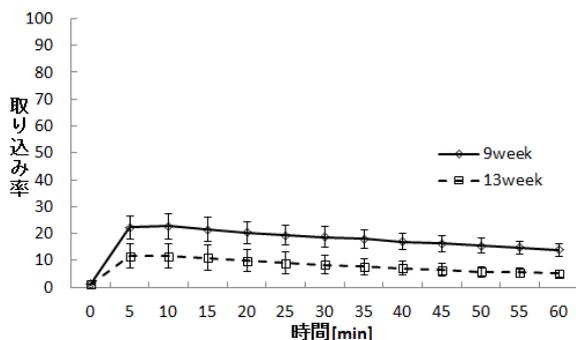


Fig. 7 正常マウス 取り込み評価

NASH マウスでは、週の経過に伴って、ICGの取り込みが大きく低下する傾向が認められた。さらに、8、10週齢では、正常マウスよりも高い

率は著しく高く、正常マウスの3倍以上の取り込み率を示した。一方、週が経過しても肝機能が不変であるはずの正常マウスでも、結果に差が現れた。

### c 洗い出し率評価

同様に ICG 投与後の時間を横軸に作成した洗い出しのグラフを Fig. 8, 9として示す。

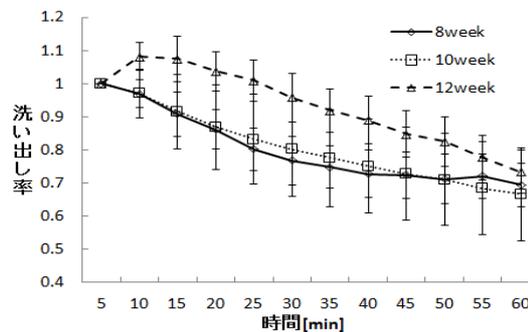


Fig. 8 NASH マウス 洗い出し評価

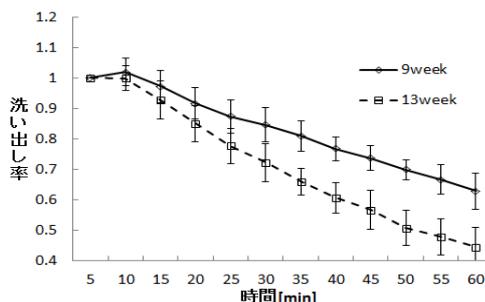


Fig. 9 正常マウス 洗い出し評価

NASH マウスにおいて、8週齢と10週齢に大きな変化はなく、12週では取り込みのピークをとる。時間の遅延が認められた。しかし12週齢のグラフの傾きを見ると、8,10週齢のものと大きく変わらないと言える。一方、正常マウスでは、取り込み率と同様に、週齢による結果の差が現れた。よってNASHマウスとの比較から、一概に結論づけることは難しいが、9週齢の正常マウスの結果は、NASHマウスのものと比較して、類似していると言える。

3) 生体高分子PPGを出発物質とし、多段階の合成過程を経てGd-PPGを得た。HPLCで精製した後に、MSで化合物を同定し、目的のGd-PPGを得ることに成功した(Fig. 10)。MSでは、目的化合物の分子式( $M = C_{153}H_{219}N_{36}O_{40}S_2Gd$ )をもとにシミュレーションした同位体パターンと実測値がほぼ一致した。HPLCでは未反応の出発物質由来のシグナルがみられ、目的化合物であるGd-PPGの収率は24%であった。一方で、収率を上げるために、HPLCの代わりに、遠心フィルターを使って分子量の差を利用した精製方法を検討した。精製過程における目的化合物の損失は軽減できたが、未反応のGd<sup>3+</sup>イオンを完全に除去することができなかった。未反応のGd<sup>3+</sup>が共存すると、MRで適切に特性評価できないため、Gd-PPGの精製方法にはHPLCを適用することが妥当であると言える。

Gd-PPG は電荷を持たない構造であるが、水や生理食塩水（リン酸緩衝性）への溶解性は保持していた。このことから、MR の造影剤としてその特性を評価していく上で溶解性に問題無いことを確認できた。

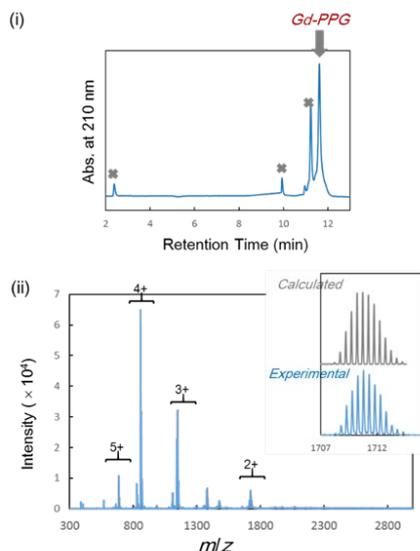


Fig. 10. (i) HPLC and (ii) MS data for Gd-PPG. (inset: isotope pattern)

Gd-PPG と同様の合成過程を経て、Gd-POG を合成した。HPLC と MS の結果を、Fig. 11 に示す。HPLC で得られた Gd-POG 由来のシグナルは、Gd-PPG に比べてブロードだった。このことは、集合体の形成を示唆していると考えられる。さらに、このサンプルの MS を測定したところ、三量体由来のシグナルが強く現れた。これは、HPLC で観られたブロードなシグナルの結果と一致する。以前の研究から、ペプチド POG のアミノ酸配列の方が、PPG のそれよりも融解温度を上昇させ、集積能を高めることが明らかになっている。そのため、本研究で新しく合成した Gd-POG は、Gd-PPG よりも高い集積能を示したと推察される。Gd<sup>3+</sup> と結合させる前段階の有機化合物では、MS 測定において集合体由来のシグナルが観られなかったことから、この高い集積特性は、Gd-POG に特異的であると推察した。超希釈条件下の MS の測定条件においても、Gd-POG が高い集積特性を示したことは興味深い。互いの集積能に差がある Gd-PPG と Gd-POG について MR 特性を評価することは、環境に応答する造影剤の開発研究において、有効な比較となる。しかし、現時点では Gd-POG の集積を制御する方法を確立するに至っていない。そのため、本研究内では、

Gd-PPG に絞って MR 特性を評価し、Gd-POG の集積能制御は、今後の課題とした。

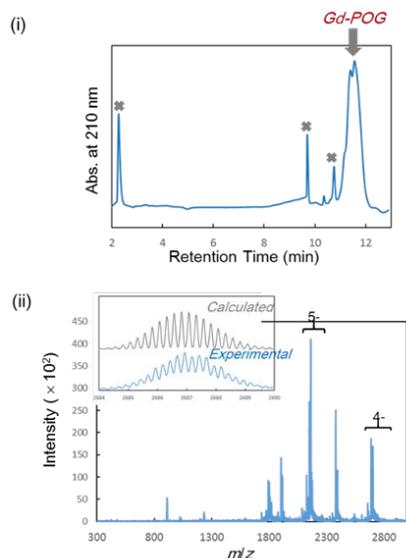


Fig. 11 (i) HPLC and (ii) MS data for Gd-POG. (inset: isotope pattern)

以上の結果をふまえて、本研究では Gd-PPG について、MR 特性を評価した。ここで、Gd-PPG のコントロールサンプルとして Gd-D03AS を合成して用いた。Gd-D03AS は、Gd-PPG から生体高分子とリンカーを除いた構造を持つように設計した。Gd-PPG と Gd-D03AS の Gd<sup>3+</sup> 近傍の基本骨格は同じであり、生体高分子の MR 特性への影響を評価するための適したコントロールサンプルになると考えた。

まず、Gd-PPG 水溶液 (0.10 mmol/L) と Gd-D03AS 水溶液 (0.10 mmol/L) の MR 特性を T1 と r1 から評価した。TI (ms) に対してシグナル強度をプロットし、続いて、Eq. 1 を用いて近似曲線を作成した (Fig. 12)。近似曲線 (点線) と実測値 (または ) が良く一致し、また、極小値の TI は、Gd-PPG (赤の点線) の方が Gd-D03AS (青の点線) よりも小さかった。ここから T1 と r1 を求めた結果を、Table 1 に示す。Gd-PPG の T1 値は、コントロールである Gd-D03AS のそれよりも小さかった。一つの要因として、Gd-PPG (MW: 3424) と Gd-D03AS (MW: 617.8) の分子量が挙げられる。

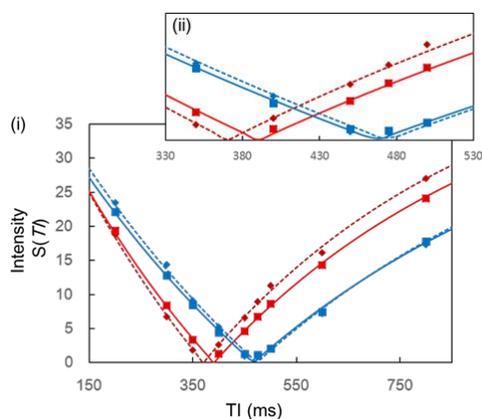


Fig. 12 Signals obtained from MR measurement (diamonds and squares) and fitted curves for Gd-PPG (in red) and Gd-DO3AS (in blue). (Dotted line: without collagen; Solid line: mixture with collagen.)

Table 1. Estimated Values of T1 (ms) and r1 (L

	Gd-PPG		Gd-DO3AS	
	none	collagen	none	collagen
T1	535	564	684	674
r1	18.7	17.7	14.6	14.8

mmol<sup>-1</sup> s) Obtained from IR Method

次に、Gd-PPG(0.10 mmol/L)および Gd-DO3AS(0.10 mmol/L)に、タンパク質であるコラーゲン(Type I)を共存させたサンプルについて、同様に MR 特性を評価した。PPG は、コラーゲン分子に対して集合能を示すことが期待できる。Fig. 12 Table1 の結果が示すように、Gd-PPG にコラーゲンを共存させたサンプルの近似曲線(赤い実線)は、Gd-PPG のみを含むサンプルのそれ(赤い点線)よりも右側にわずかだがシフトした。同じコラーゲンの濃度で、Gd-DO3AS に対して評価したところ、青い実線と点線はほとんどシフトしなかった。Gd-PPG の MR 特性は、コラーゲンの有無によって Gd-DO3AS よりも大きな影響を受けたことが示された。Gd-PPG の T1 値が、535 ms から 564 ms にシフトしたのは、Gd-PPG が巨大なコラーゲン分子の線維に集合して複合体を形成したことが寄与していると推察できる。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1) Masayuki Honda, Aoi Odawara, Ikuro Suzuki, Morio Shimada, Koki Yoshikawa and Tomoko Okada. “Near-Infrared-Responsive Peptide that Targets Collagen Fibrils to Induce Cytotoxicity” *Photochemistry and Photobiology*, 査読有, 2016, 92 (5), 767 - 770. DOI: 10.1111/php.12621

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

嶋田 守男(Shimada, Morio)  
駒澤大学・医療健康科学部・教授  
研究者番号：20196489

(2)研究分担者

吉川 宏起(Yoshikawa, Kohki)  
駒澤大学・医療健康科学部・教授  
研究者番号：10272494

岡田 朋子(Okada, Tomoko)

駒澤大学・医療健康科学部・講師  
研究者番号：60409795

森口 央基(Moriguchi, Hisamoto)

駒澤大学・医療健康科学部・教授  
研究者番号：70296705

桐生 茂(Kiryu, Shigeru)

東京大学医科学研究所・放射線科・准教授  
研究者番号：20313124

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者